

マミズイトミミズの酸可溶性化合物に ついて (Ⅱ)

— 分 画 と 同 定 —

The Components of Acid-soluble Fraction
Obtained from *Rhizodrilus limasus* (Ⅱ)

Fractionation and Identification
of the Components

大 山 重 信

Shigenobu Ooyama

(Received. April 19, 1974)

The acid soluble fraction obtained from a sludge worm, *Rhizodrilus limasus*, was subjected to an ion exchange chromatography using Dowex 1, formate form. Some fractions separated by this procedure were moreover subjected to a rechromatography using the resin Cl form, and the fractions separated by the rechromatography were identified through the determination of acid-labile P, total P and pentose contents as well as their ultraviolet absorption curves. The obtained results were as follows.

1. Seven fractions were obtained by a chromatography using Dowex 1, formate form and the separation of these fractions in chromatogram was better than that in the previous paper ⁷⁾.
2. Four fractions of these were identified as guanine, AMP, ADP, and ATP, respectively.
3. An attempt to culture *Rhizodrilus limasus* artificially was found to be unsuccessful.

I 緒 言

さきに筆者は小林らとともにマミズイトミミズの酸可溶区分を抽出し、CI型樹脂により分画した後同定を行ない、マミズイトミミズによつて水中から吸収された ^{32}P がイトミミズの体内でどのような化学形態で存在するかを明らかにした¹⁻⁶⁾。また、CI型樹脂においてはヌクレオチド相互の分離が必ずしもよくないのでFormate型樹脂によって酸可溶性化合物を分画し、その分画の模様を先に報告するとともに、分画のうち1個はグアニンであり、3個はアデノシン系物質であることを認めた⁷⁾。

今回はこれらの結果を考慮し、イオン交換クロマトに用いる溶出剤を僅かに改変することにより分画の分離の模様を前報⁷⁾におけるよりも改善するとともに、一部の分画については化学的分析をこころみ、グアニン、AMP、ADP、およびATPであることを認めたのでこれらの結果について述べることとする。

II 実 験 方 法

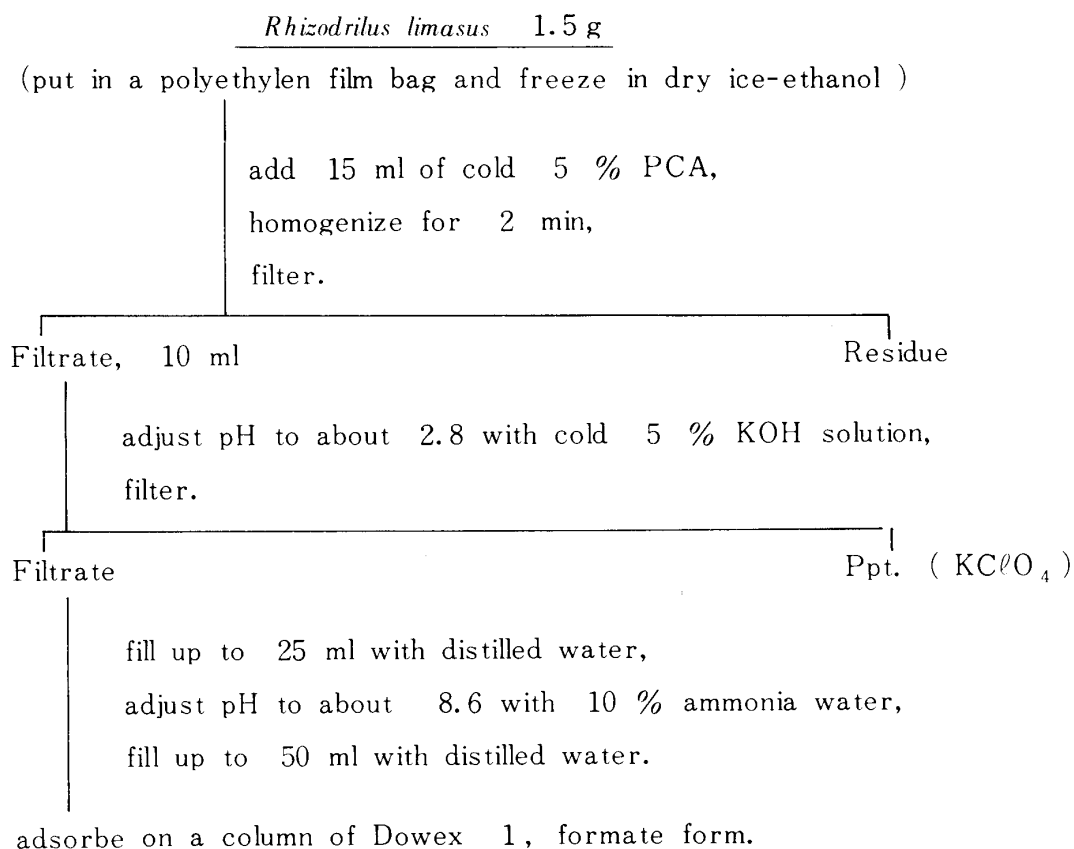
1. 試 料

マミズイトミミズ、*Rhizodrilus limasus*, を用いた。前報⁷⁾と同様に、採取したイトミミズはえさを与えずに3日間流水中に飼育して汚物を排泄させるとともに一匹ずつ肉眼で選別し傷ついているものはすべて除外した。このように選別、飼育した後イトミミズに付着する水分を濾紙で除いてから1.5gを秤量し、直ちにポリエチレン袋に包んでドライアイス・エタノールの寒剤中に約5分間浸漬して凍結した。

2. 酸可溶区分の抽出

試料の凍結からイオン交換樹脂への吸着に至るまでの操作はScheme 1 に示した通りである。すなわち、予め氷冷した5%過塩素酸溶液15mlをホモゲナイザー・カップにとり、この中へ凍結したイトミミズ1.5gを入れ、カップの外側を食塩・氷で冷却しながら2分間ホモゲナイズし、東洋濾紙No.6(予め過塩素酸溶液で洗滌したもの)で濾過した。この濾液10mlをとり、氷冷しながら5%苛性カリ溶液を徐徐に加えて十分に沈澱を析出させてpH 2.8程度とし、再び濾過して沈澱を除去した後10%アンモニア水でpH 8.6程度としてから水を加えて50mlとし、樹脂に吸着させた。

Scheme 1. Preparation of acid-soluble fraction from *Rhizodrilus limasus* and the treatment of the fraction prior to ion exchange chromatography.



3. イオン交換樹脂の活性化

Dowex 1, $\times 2$, 200~400 meshを用い、常法⁸⁾に従がい前処理を行なって一旦Cl型に変え、これをカラムに充填し、ギ酸とギ酸ナトリウムとの混液を充分量流した後蒸留水で洗いFormate型とした。

4. Formate 型樹脂によるイオン交換クロマトグラフィ

前報⁷⁾における溶出の模様を参考にして、Bergkvist らの方法⁹⁾を一部改変した前報の溶出剤をさらに一部改変し、次の9種の溶出剤を用いた。すなわち、

- I. 0.05 M ギ酸
- II. 0.1 M ギ酸
- III. 0.1 M ギ酸 + 0.05 M ギ酸ナトリウム

IV. 0.1 M ギ酸 + 0.1 M ギ酸ナトリウム

V. 0.1 M ギ酸 + 0.2 M ギ酸ナトリウム

VI. 0.1 M ギ酸 + 0.3 M ギ酸ナトリウム

VII. 0.1 M ギ酸 + 0.4 M ギ酸ナトリウム

VIII. 0.1 M ギ酸 + 0.6 M ギ酸ナトリウム

IX. 0.1 M ギ酸 + 1 M ギ酸ナトリウム

溶出剤の溶出速度は 0.7ml/min でフラクション・コレクターにより 5ml ずつ分取し分光光度計により $260\text{m}\mu$ における吸光値を測定し溶出図を作製した。

5. 再クロマトグラフィ

Formate 型樹脂を用いてクロマトを行ない、得られた溶出液のうち適当な分画を集めてアニオン濃度が 0.01M 以下¹⁰⁾ となるよう蒸留水で希釈した後アンモニア水で $\text{pH}8.6$ 程度としDowex1, $\times 2$, $200\sim 400\text{mesh}$, Cl型樹脂 ($1.13\text{cm}^2 \times 5\text{cm}$) に吸着させ, Cohn-Carter 法¹¹⁾ に準じて HCl-NaCl 系溶出剤で溶出し, 溶出液は 5ml ずつ分取し, $260\text{m}\mu$ における吸光値を測定して溶出図を作製し, この溶出液のうち適当なものを用いて次に述べる分析方法により分析を行なった。

6. 分析方法

(1) 紫外部吸収曲線による同定および分子吸光係数

再クロマトを行なって得られたピークについては pH を酸性, 中性, アルカリ性とした場合と, 塩酸の 1N 濃度となるように濃塩酸を計算量加えて 100°C で 1 時間加水分解した後, 1N 塩酸溶液のままの吸収曲線および pH を中性およびアルカリ性に変えた場合の吸収曲線を求め, 文献記載の吸収曲線¹²⁾ と比較して物質名を定めた。

アデノシンの分子吸光係数は $14,200$ ($\text{pH } 2, 260\text{m}\mu$)¹²⁾ を用いた。

(2) Acid-labile 燐および全燐の定量

いずれも Bartlett の方法¹³⁾ に準じて行なった。

(3) Pentose (Ribose) の定量

Mejbaum 法¹⁴⁾ を Albaum ら¹⁵⁾ および Leuthardt ら¹⁶⁾ が改変した方法によって定量した。Pentose の標準曲線は $5'-\text{AMP}$ を用いて作製した。

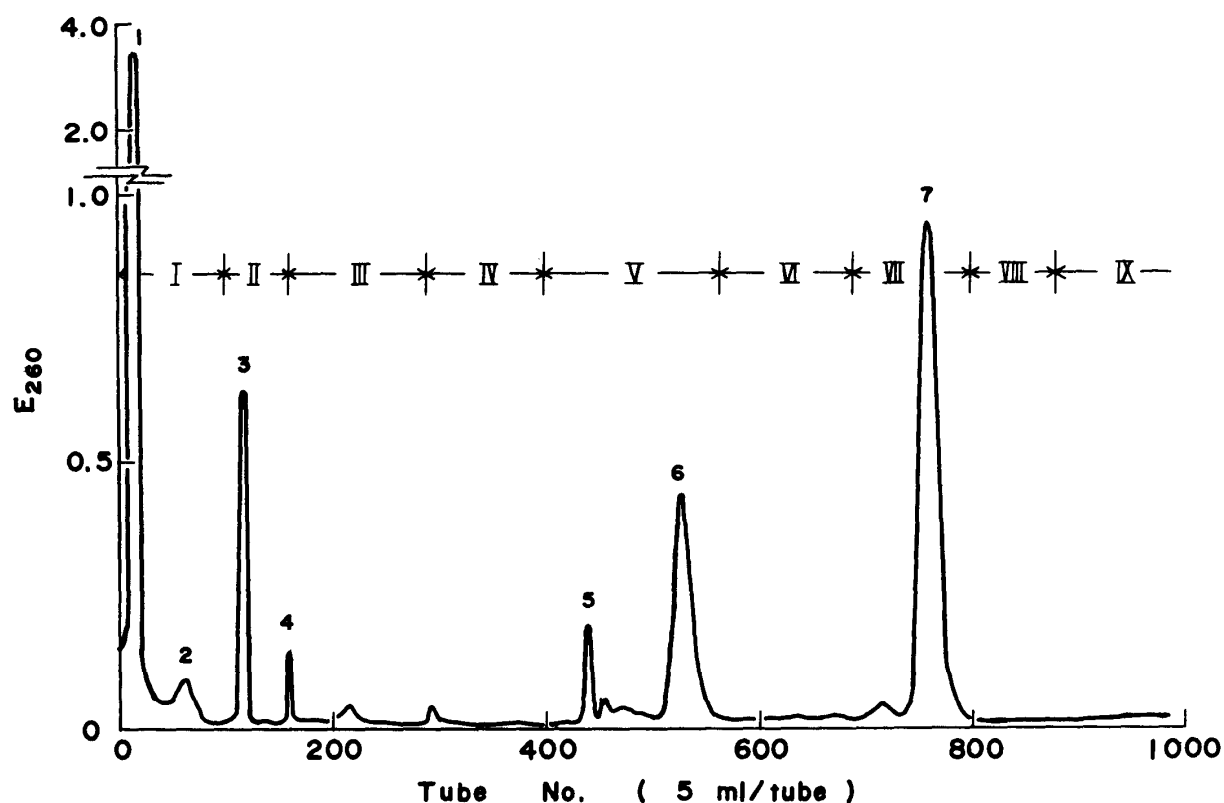


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of PCA extract from *Rhizodrilus limasus*.
Sample ; PCA extract from *R. limasus* was treated as shown in Scheme 1,
and then equivalent to 6.22g of fresh *R. limasus* was subjected to the chroma-
tography.

Resin ; Dowex 1, $\times 2$, 200—400 mesh, formate form.

Column size ; $1.54\text{cm}^2 \times 18\text{cm}$. Flow rate ; $0.7\text{ml} / \text{min}$.

Eluents ;

I	0.05 M formic acid
II	0.1 M formic acid
III	0.1 M formic acid + 0.05 M sodium formate
IV	0.1 M formic acid + 0.1 M sodium formate
V	0.1 M formic acid + 0.2 M sodium formate
VI	0.1 M formic acid + 0.3 M sodium formate
VII	0.1 M formic acid + 0.4 M sodium formate
VIII	0.1 M formic acid + 0.6 M sodium formate
IX	0.1 M formic acid + 1 M sodium formate

Ⅲ 実験結果および考察

イトミミズ生鮮6.22g 相当量の抽出液をイオン交換樹脂カラム (1.54cm²×18cm) に吸着させて溶出した場合の溶出図はFig. 1に示すようになり、小さなピークを除いて1 から7 に至る7 個のピークが得られた。前報⁷⁾ で用いた溶出剤を一部改変したため各ピークの分離は前報におけるよりもさらに良好であった。得られたピークのうち、吸光値の低いものは量的に充分でないため同定できなかったが、ピーク1, 3, 6, 7 については再クロマトを行ない、ギ酸およびギ酸塩を除いた後吸収曲線を調べるとともにacid-labile 燐、全燐およびリボース量を定量した。その結果は次のようになった。

ピーク1： 紫外外部吸収曲線の模様が、塩酸による加水分解前と後とで変わらず、グアニンと判定された。

ピーク3： 塩酸分解前の吸収曲線はアデノシンであることを示し、分解後はアデニンであることを示していた。Acid-labile燐は殆んど定量されず、リボースと全燐の塩基に対するモル比はそれぞれ0.83および1.23であり、AMP と判定された。

ピーク6： 塩酸分解前後の吸収曲線はそれぞれアデノシンおよびアデニンの特長を示し、塩基に対するリボース、acid-labile 燐、全燐のモル比は0.92:1.03:0.98となることからADP と判定された。

ピーク7： 塩酸分解前後の吸収曲線はピーク3 および6 と同様にアデノシンおよびアデニンの特長をもっており、リボース、acid-labile 燐、全燐のモル比は0.88:0.83:0.83 となったことから ATP と判定された。

これらの結果は Table 1 にまとめて示した。

イトミミズを多量に採取できなかったため樹脂に吸着させた試料量は前報⁷⁾ と同じであったが、クロマトにおける分画の分離状態は改善され各ピークはよく分離されていた。本報において同定したピークは4 個にすぎず、いづれも以前に筆者らがイトミミズにその存在を認めた¹⁻⁶⁾ ものであったが、試料量および樹脂量を増加すれば、さらに一層詳細な同定が可能となるであろう。

前報⁷⁾ において筆者は、一般に生物においてはそのヌクレオチド中に ATP が最も多量存在するものと考えたが、今回の分析においても塩基であるグアニンを除いては ATP のピークが最も大きく、ATP がヌクレオチド中最も多量であることを重ねて確認した。

なお、近年下水溝設備が完備するにつれてイトミミズの棲息に好適な場所が殆んど見られなくなってきており、イトミミズの採取が難かしくなってきたので、実験室で木箱の中にイトミミズの棲息場所からとった泥を入れ水道水が適当量流れるようにして飼育培養を試みたが成功せず、予想したほどには簡単でなかった。おそらくは日照、日照時間、温度等の条件が不適当なため成功しなかったものと思われ、これらの諸条件についても検討を要するものと考えられた。

Table 1. Data of analysis for ribose, acid-labile P, total P of the fractions separated by ion exchange chromatography.

Fraction No.	Spectral type		Molar ratio to base			Identification
	Before hydrolysis with 1N HCl	After hydrolysis with 1N HCl	Ribose *	Acid-labile P**	Total P**	
1	Guanine	Guanine				Guanine
3	Adenosine	Adenine	0.83	neg.	1.23	AMP
6	Adenosine	Adenine	0.92	1.03	0.98	ADP
7	Adenosine	Adenine	0.88	0.83	0.83	ATP

* : determined by the Meibbaum's method¹⁴⁾ modified by Albaum et al¹⁵⁾ and Leuthardt et al¹⁶⁾.

** : determined by the Bartlett's method¹³⁾.

Ⅳ 要 約

マミズイトミミズから得られた酸可溶区分についてDowex 1, Formate 型樹脂を用いてイオン交換クロマトを行なうとともにCl型樹脂により再クロマトを行ない、紫外吸収曲線を調べ、燐および糖量を定量して同定を試み、次のような結果を得た。

1. Formate 型樹脂によるクロマトによって7個の分画が得られた。前報⁷⁾で用いた溶出剤を一部改変したために分画の分離の様子は前報におけるよりも著しく改善された。
2. 7個の分画のうち4個はそれぞれ、グアニン、AMP、ADP およびATP であることを認めた。
3. イトミミズの人工飼育を試みたが成功せず、日照、温度等の諸条件について検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) 小林邦男・富山哲夫： 水棲生物における ^{32}P の吸収および代謝に関する研究—I．マミズイトミミズによる ^{32}P の吸収および代謝． 日水誌. , **25**, 576～580 (1959)
- 2) 小林邦男・大山重信・富山哲夫： 水棲生物における ^{32}P の吸収および代謝に関する研究—II． マミズイトミミズに吸収された ^{32}P の各種酸可溶性燐化合物への分布． 日水誌. , **26**, 338～342 (1960)
- 3) 小林邦男・大山重信・富山哲夫： 水棲生物における ^{32}P の吸収および代謝に関する研究—II． 水中 ^{32}P の各種酸可溶性燐化合物への移行について． 日本水産学会秋季大会発表． 昭34.10 (1959)
- 4) 小林邦男・富山哲夫： 水中 ^{32}P の各種酸可溶性燐化合物への移行について． 日本農学大会水産部会，水族生理シンポジウムにおいて発表． 昭35.4 (1960)
- 5) 大山重信・小林邦男・富山哲夫： 水棲生物における ^{32}P の吸収および代謝に関する研究—IV． マミズイトミミズの各種酸可溶性燐化合物の再クロマトグラフィによる分離と同定． 日本農学大会水産部会発表． 昭36.4 (1961)
- 6) 富山哲夫： 放射性同位元素による物質代謝の研究． 日本水産学会秋季大会，水産と放射線に関するシンポジウムにおいて発表． 昭36.10 (1961)
- 7) 大山重信： マミズイトミミズの酸可溶性化合物について (I)． 酸可溶性化合物の分画． 鹿児島県立短大紀要. **24**, (自然科学篇), 1～13 (1973)
- 8) 宮本侃治・中尾 眞・田中伸一： 燐酸代謝実験法(I) (吉川・高橋編著), p.158, 広川書店 (1958)
- 9) R. Bergkvist and A. Deutsch : Ion Exchange Chromatography of Nucleoside Polyphosphate. *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1877～1879 (1954)
- 10) 宮本侃治・中尾 眞・田中伸一： 燐酸代謝実験法(I)． (吉川・高橋編著). p. 177. 広川書店 (1958)
- 11) W. E. Cohn and C. E. Carter : The Separation of Adenosine Triphosphates by Ion Exchange and Paper Chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4273～4275 (1950)
- 12) E. Chargaff and J. N. Davidson : The Nucleic Acids. Academic Press Inc., New York (1955)
- 13) G. R. Bartlett : Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466～468 (1959)

- 14) W. Meibaum : Über die Bestimmung Kleiner Pentosemengen. *Z. physiol. Chem.*, **258**, 117~120 (1930)
- 15) H. G. Albaum and W. W. Umbreit : Differentiation between Ribose-3-Phosphate and Ribose-5-Phosphate by Mean of the Orcinol-Pentose Reaction. *J. Biol. Chem.*, **167**, 369~376 (1947)
- 16) F. Leuthardt and B. Exer : Untersuchungen über die Ribosenuklein Säure und Lipidanteil (Steroid) der Lebermitochondrien. *Helv. Chim. Acta*, **36**, 500~518 (1953)